



CURSO DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM IMPLANTODONTIA

BRUNO ALMEIDA PESSOA LINS

**IMPLANTES DE ZIRCÔNIA:
AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA EM MAXILARES HUMANOS**

Guarulhos

2014

CURSO DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM IMPLANTODONTIA

BRUNO ALMEIDA PESSOA LINS

**IMPLANTES DE ZIRCÔNIA:
AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA EM MAXILARES HUMANOS**

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos para a
obtenção do título de Mestre em odontologia.

Área de Concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Awad Shibli

Co-Orientadora: Prof. Dra. Alessandra Cassoni

Guarulhos

2014

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "IMPLANTES DE ZIRCÔNIA: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA EM MAXILARES HUMANOS" em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2014, considerou o candidato BRUNO ALMEIDA PESSOA LINS aprovado.

COMISSÃO EXAMINADORA

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca

1. Prof. Dr. Jamil Awad Shibil (UnG)

L759i

Lins, Bruno Almeida Pessoa
Implantes de zircônia: avaliação histológica em maxilares humanos /
Bruno Almeida Pessoa Lins – 2014.
40 f.; 31 cm.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Awad Shibil

2. Prof. Dr. José Augusto Rodrigues (UnG)

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Pós – Graduação
e Pesquisa, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2014.

1. Implantes dentários. 2. Implantes de zircônia. 3. Implante de titânio. 4.
Contato osso implante. 5. Histometria I. Jamil Awad Shibil. II.
Universidade Guarulhos III. Título.

CDD. 617

3. Prof. Dr. José Augusto Rodrigues (UnG)

Guarulhos, 27 de Fevereiro de 2014.



CEPPE
Centro de Pós-Graduação e Pesquisa

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "IMPLANTES DE ZIRCÔNIA: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA EM MAXILARES HUMANOS" em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2014, considerou o candidato BRUNO ALMEIDA PESSOA LINS aprovado.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Prof. Dr. Jamil Awad Shibli (UnG)

2. Prof. Dr. Marcelo Sabbag Abla (CA)

3. Prof. Dr. José Augusto Rodrigues (UnG)

Guarulhos, 27 de Fevereiro de 2014.

Dedico este trabalho ao meu filho Rafael Lins, que nasceu durante o período do curso nos proporcionando tantas alegrias, bem como a minha esposa, que soube compreender, como sempre, minhas ausências.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Deus pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À minha esposa Emily Medeiros pelo amor, apoio e compreensão.

Aos meus pais e minhas irmãs pelo incentivo.

Ao Professor Doutor Jamil Awad Shibli, pela troca de experiências e por me estimular na busca do conhecimento científico.

AGRADECIMENTOS

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, a saber, Profa. Dra. Magda Feres, Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo, Prof. Dr. Jamil Awad Shibli, Profa. Dra. Alessandra Cassoni, Profa. Dra. Marta Bastos, Prof. Dr. José Augusto Rodrigues, Prof. Dr. Leandro Chambrone, Profa. Dra. Gabriela Giro Araujo, pela paciência e contribuição na minha formação.

Aos meus colegas de curso, pela afinidade, troca de experiências e acima de tudo solidariedade.

Aos meus amigos e incentivadores Prof. Dr. Leonardo Rocha e Prof. Dr. Diogo Menezes.

Aos funcionários da Universidade Guarulhos.

Aos pacientes e colaboradores da pesquisa.

RESUMO

Os implantes de Zircônia são biocompatíveis, bioinertes, radiopacos e apresentam uma elevada resistência à corrosão, flexão e fratura. Contudo, a literatura é muito escassa no que diz respeito ao comportamento clínico e biológico destes dispositivos intra-ósseos. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar os parâmetros histométricos de osseointegração dos implantes de zircônia, comparados a implantes de titânio. Oito indivíduos (5 mulheres e 3 homens), maiores de 21 anos, que apresentavam necessidade de reabilitação bucal na região posterior de maxila foram incluídos no presente estudo. Foram utilizados dezesseis micro-implantes em forma de parafuso com 2,2mm de diâmetro e 4mm de comprimento, preparados com titânio grau-4 e superfície tratada com jateamento de Al_2O_3 e condicionamento com o ácido HNO_3 (grupo controle) e micro-implantes de zircônia tetragonal policristal estabilizada com ítrio (grupo teste). Após um período de 60 dias de reparo, os implantes foram removidos por meio de broca trefina, juntamente com o tecido peri-implantar circunjacente. Foram medidos o contato osso-implante (COI) e a área de tecido ósseo presente entre as roscas dos implantes (DO). As biópsias foram preparadas para análise histométrica. A avaliação da quantidade de tecido ósseo em contato com a superfície do implante (COI) não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos do estudo. Por outro lado, na comparação da quantidade da área de rosca preenchida por tecido ósseo (DO%), observou-se diferença estatística entre os grupos ($p=0,0483$), com DO médio de 49,32% para o grupo teste e 57,8% para o controle. Os dados deste estudo sugerem uma similaridade de resposta histológica entre os implantes avaliados nesta fase de cicatrização.

Palavras-Chave: Implantes Dentários; Implantes de Zircônia; Implantes de titânio; Contato Osso Implante; Histometria.

ABSTRACT

Zirconia dental implants are biocompatible, bioinert, radiopaque and have high satisfactory resistance to corrosion, bending and fracture. The literature is very limited with respect to clinical and biological behavior of intraosseous devices. Therefore, the aim of this study was to evaluate the histometric parameters of osseointegration of zirconia implants compared with titanium implants. Eight subjects (5 women and 3 men), with age more than 21 years, whose needed oral rehabilitation with dental implants in the posterior maxilla were included in this study. Sixteen micro-implants with a diameter of 2.2 mm and 4 mm in length; eight titanium micro-implant, made with titanium grade-4 and surface treated with blasting of Al_2O_3 and conditioning with HNO_3 acid (control group) and micro-implants of tetragonal polycrystal zirconia stabilized with yttrium (test group) were used. After a period of 60 days of bone healing implants were removed by trephine drills, along their axis, with the peri-implant surrounding tissue. Biopsies were prepared for histometric analysis. The evaluation of the amount of bone tissue in contact with the implant surface (COI%) showed no statistically significant difference between the study groups. On the other hand, comparing the bone area fraction occupancy (DO%), control group presented amount of bone between the screws, with statistical significant difference in relation to the test group ($p = 0.0483$). Data from this study suggest a similarity of histological response between the implants evaluated in this healing phase, although the zirconia implants presented lower bone formation between the screws.

Key-Words: Dental Implants; Zirconia Implants; Titanium Implants; Bone to Implant Contact; Histometry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
1.1- Estudos in vitro	14
1.2- Estudos em animais.....	15
1.3- Estudos em humanos	19
2. OBJETIVO.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Considerações éticas	23
3.2 Seleção dos indivíduos	23
3.3 Critérios de inclusão dos indivíduos na amostra	23
3.5. Critérios de exclusão de indivíduos da amostra.....	24
3.6. Implantes Utilizados	24
3.7. Desenho experimental e protocolo cirúrgico utilizado	24
3.8. Processamento histológico das amostras e análise histométrica	25
3.9. Análise estatística	27
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO.....	33
7. REFERENCIAS.....	34

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os implantes de titânio têm sido utilizados em larga escala, de forma confiável, com eficácia comprovada em longo prazo, por meio de vários estudos científicos (Branemark et al., 1969; Adell et al., 1990; Jemt et al., 1996; Albrektsson et al., 2000; Malo et al., 2011; Dierens et al., 2012). O percentual de contato osso-implante (COI%) do titânio, demonstrado nos estudos em animais e humanos variam entre 25 e 70%, dependendo de alguns fatores, dentre eles o tipo de superfície, qualidade óssea e técnica cirúrgica empregada (Buser et al., 1991; Wennerberg et al., 1995; Piattelli et al., 1998; Buser et al., 1998; Hallgren et al., 2001; Ivanoff et al., 2001; Ivanoff et al., 2003; Kohal et al., 2003; Degidi et al., 2003; Shibli et al., 2007).

As etapas da formação óssea e osseointegração dos implantes de titânio foram estudadas em cães por Berglundh et al. 2003 e Abrahamsson et al. 2004. As biópsias foram realizadas 02 horas após a instalação dos implantes, até 12 semanas de cicatrização.

Na primeira análise foram observadas a presença de um coágulo contendo hemácias, neutrófilos e monócitos/macrófagos, em uma rede de fibrina.

No quarto dia de reparação o coágulo foi substituído por um tecido de granulação, que continham células mesenquimais, componentes da matriz e neoformação vascular.

Após 01 semana, iniciava a modelação óssea, havia um tecido conjuntivo provisório rico em vasos e células mesenquimais. Processos inflamatórios eram escassos nessa fase, com um tecido ósseo rico em células imaturas foi encontrado nos tecidos mesenquimais que circundavam os vasos sanguíneos, podendo ser observados em contato direto com o titânio.

Na segunda semana, a formação de osso imaturo era mais presente, alcançando a superfície do implante.

Após quatro semanas um osso mineralizado esponjoso primário estava presente, rico em vasos e células mesenquimais. A partir da sexta semana o tecido ósseo mostrou-se em fase de remodelação, com presença de ósteons primários e secundários, em contato com o implante. Medula óssea, contendo vasos, adipócitos e células mesenquimais foram encontradas circundando as trabéculas

de osso mineralizado.

Shibli et al. (2007), ao realizar um estudo comparativo entre superfícies de implantes de titânio, em humanos, (superfície lisa - grupo controle e jateados, tratados com ácido- grupo teste) pôde observar que os tecidos histológicos, após 8 semanas, apresentavam sinais de normalidade. O tecido ósseo antigo era lamelar e compacto, com diversos osteócitos em suas lacunas, com áreas entrelaçadas de tecido mineralizado. Já o tecido ósseo neoformado presente na interface osso-implante apresentava vários estágios de maturação e remodelação, sendo esta característica mais acentuada nos micro-implantes do grupo teste. Alguns micro-implantes do grupo controle apresentavam uma descontinuidade entre as finas trabéculas ósseas localizadas junto ao leito receptor e a superfície do implante. Já no grupo teste uma fina camada de tecido ósseo trabecular estava interposta entre o osso antigo e a superfície do implante. A área ao redor dos implantes de superfície lisa apresentava uma fina camada de tecido conjuntivo denso, entre a interface osso-implante. O COI médio para os implantes do grupo controle foi de 21,71% e para os do grupo teste foi de 41,84%.

Embora os implantes de titânio apresentem características favoráveis à sua utilização, muito bem elucidada em vários estudos, como descrito anteriormente, a literatura aponta algumas desvantagens como a possibilidade de provocar processos alérgicos, conforme relatado por Yamauchi et al. (2000); Sicília et al. (2008), Pigatto et al. (2009) e Javed et al. (2013), bem como a possibilidade de acúmulo de partículas de titânio em vasos linfáticos locais (Weingart et al., 1994; Frisken et al., 2002).

Degidi et al. (2013) comparou, do ponto de vista imuno-histoquímico, a matriz de metaloproteinases 2, 3, 8, 9 e 13, relacionadas à doença periodontal, na região peri-implantar de pilares de cicatrização de titânio e zircônia, encontrando diferenças estatísticas significativas nas quantidades dessas proteínas, mostrando-se maiores ao redor do titânio, sugerindo um processo inflamatório mais intenso.

Em função da sua tonalidade acinzentada, os implantes de titânio também podem influenciar de forma desfavorável na estética de reabilitações implantossuportadas, principalmente em regiões anteriores, nos pacientes cujo biotipo gengival seja fino, podendo provocar uma zona escurecida, o que compromete o sucesso do tratamento, tornando-se um desafio aos especialistas que lidam com essas situações (Verdugo et al., 2009; Nisapakultorn et al., 2010).

A Zircônia (ZrO_2) é um material cerâmico utilizado em implantodontia devido a sua biocompatibilidade, estética e propriedades mecânicas. Os implantes desses materiais são biocompatíveis, bioinertes, radiopacos e apresentam uma elevada resistência à corrosão, flexão e fratura (Scarano et al., 2003). Segundo Kan et al. (2011) e Siddiqi et al. (2011) a zircônia é um material inerte, que apresenta mínima liberação de íons, em comparação com implantes metálicos e possui excelente propriedades físicas. Outra vantagem relatada é a sua capacidade de aumentar a adesão e proliferação de fibroblastos e osteoblastos (Bianchi et al. 2004), assim como sua baixa afinidade pela placa bacteriana, reduzindo os riscos de processos inflamatórios dos tecidos peri-implantares (Akagawa et al., 1998, Rimondini et al., 2002, Scarano et al., 2003).

Além disso, os resultados de testes *in vitro*, por meio de células cultivadas em placas de zircônia, de carcinogenicidade e teratogenicidade foram negativos (Covacci et al., 1999).

Portanto, esta alternativa à substituição dos implantes de titânio pode ser viável, com taxas de osseointegração semelhantes aqueles, comprovadas em pesquisas realizadas em animais (Sennerby et al., 2005; Hoffmann et al., 2008; Rocchietta et al., 2009; Dohan Ehrenfest et al., 2010). Alguns estudos de implantes de zircônia mostram até mesmo resultados ligeiramente superiores (Koch et al. 2010, Stadlinger et al. 2010, Aboushelib et al. 2013). No entanto, estas pesquisas padecem de limitações inerentes ao modelo experimental, as quais impedem a extrapolação dos resultados em seres humanos. Esses eventos como: tempo de cicatrização, reparo celular do tecido ósseo, diferenças nas absorções, tanto dos componentes celulares, quanto das proteínas, são fundamentais no processo regenerativo e devem ser analisadas com mais afinco, posteriormente em humanos (Lundgren et al., 1999; Ivanoff et al. 2001; Shibli, 2007; Ivanoff et al., 2003). Portanto, alguns autores têm proposto a utilização de implantes com as mesmas superfícies dos disponíveis comercialmente, mas com dimensões reduzidas, para realização de biópsias que viabilizem esses estudos *in vivo*, os quais avaliem o percentual de osseointegração em humanos (Lundgren et al., 1999; Ivanoff et al., 2001; Ivanoff et al., 2003; Trisi et al., 2003; Rocci et al. 2003; Kohal et al., 2003; Shibli et al., 2007).

1.1- Estudos in vitro

Gong et al. (2013) realizaram um estudo comparativo em culturas de osteoblastos (MC3T3-E1) sobre discos de titânio e zircônia, para avaliar o comportamento de adesão e crescimento dessas células, por meio da expressão gênica. O ensaio colorimétrico foi utilizado para a análise da fixação das células. A morfologia celular foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (SEM) e a fosfatase alcalina (ALP) foi medida para avaliar a taxa de diferenciação celular. Nos resultados do MTT, não houve diferença significativa entre o titânio e dióxido de zircônio ($P > 0,05$). A partir da imagem de SEM, depois de 4 horas de cultura, as células de ambos os discos apresentaram-se triangulares ou alongadas com a formação de filópodos. Após 24 horas de cultura, as células de ambos os discos apresentavam-se mais achatadas e bem distribuídas em comparação com 4 horas de cultura. A partir do ensaio de atividade de ALP, a densidade óptica das células em titânio era ligeiramente maior do que a de células em zircônia, mas não houve diferença significativa ($P > 0,05$). A maioria dos genes relacionados com a adesão celular mostrou nível de expressão semelhante entre titânio e zircônia. Esta, portanto, mostrou resultados biológicos celulares semelhantes ao titânio, para um curto período de tempo, durante a cultura das células.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Han et al. (2011) realizaram um estudo, cujo objetivo foi comparar o comportamento de osteoblastos cultivados em discos de zircônia e titânio, combinada com matriz óssea desmineralizada (DBM) e ainda, com proteínas morfogenéticas ósseas tipo 2 (BMP-2). As células MC3T3-E1 foram cultivadas e gravadas. Ao fim de 24 horas após semeadura das células, a matriz óssea desmineralizada (DBM) gel sozinho e o gel DBM com BMP-2 foram adicionados ao meio de cultura. A topografia da superfície foi analisada por microscopia confocal de varredura a laser. A proliferação celular foi medida a 1, 4 e 7 dias após o carregamento do gel. Atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi avaliada aos 7 dias após inclusão do gel. A expressão do RNAm de ALP, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, Runx -2, osteocalcina e osterix foram avaliados em tempo real por reação em cadeia da polimerase em 4 dias e 7 dias. Em 1, 4 e 7 dias após o carregamento do gel DBM sozinho e o gel DBM com BMP - 2, a proliferação celular na zircônia e nos discos de titânio eram semelhantes e que os grupos de cultura com o gel de DBM sozinho e o gel de DBM com BMP - 2 não

foram estatisticamente significantes, com exceção de titânio com gel de BMP -2. A atividade da fosfatase alcalina foi maior nas células cultivadas com BMP - 2 do que nos outros grupos, mas não havia diferença entre o dióxido de zircônia e titânio. A expressão gênica da fosfatase alcalina, sialoproteína óssea, osteocalcina, RUNX2 e osterix foi muito mais intensa nas células cultivadas na zircônia ou titânio associado ao gel de BMP-2 do que nas células cultivadas em titânio sem o gel, no sétimo dia do experimento. A expressão gênica das células cultivadas em zircônia com BMP-2 foi maior do que as células cultivadas com gel sobre o titânio, neste dia. Após o carregamento do gel DBM e o gel DBM com BMP -2, a proliferação celular na zircônia e nos discos de titânio eram semelhantes, não apresentando diferença estatística. Com a estimulação de BMP - 2, ambos apresentaram uma proliferação e diferenciação osteoblástica maior, embora a zircônia, nessa situação, tenha tido um efeito mais pronunciado em comparação com titânio.

1.2- Estudos em animais

Diversas pesquisas avaliaram o comportamento histológico dos implantes de zircônia em animais. Hoffmann et al. (2008) avaliou quatro diferentes superfícies de implantes instalados em coelhos: óxido de zircônia com uma superfície sinterizada; zircônia modificada por laser; óxido de zircônia modificada com jateamento de sílica; implantes com superfície de titânio modificadas por ataque ácido. Foram instalados 92 implantes em quarenta e oito coelhos. Um implante foi colocado em cada um dos fêmures traseiro de cada coelho. Metade dos implantes foram utilizados para exame histológico em 6 e 12 semanas após a inserção do implante, a outra metade foram submetidos a teste de torque de remoção. Na avaliação histológica observou-se aposição óssea em torno de todos os implantes independente da superfície. Em 6 semanas, o contato osso-implante (COI) médio foi 32,996% para a zircônia sinterizada, 39,965% para a zircônia modificado por laser, e 39,614% para a modificada com jateamento de areia e de 34,155% para os implantes de titânio. Em 12 semanas, os implantes mostraram COI de 33,746%, 43,87%, 41,350% e 34,818%, respectivamente. Não houve diferenças estatisticamente significativas no COI entre as superfícies dos implantes deste estudo. Os valores de torque de remoção variaram entre 35,409 Ncm para a zircônia sinterizada, 26,309 Ncm para a zircônia modificada por laser, 19,590 Ncm

para a zircônia modificada por jateamento de sílica, e 39,818 para o de titânio com 6 semanas. Os resultados correspondentes ao tempo de 12 semanas foram 40,591 Ncm, 39,708 Ncm, 28,727 Ncm e 51,909 Ncm, respectivamente. Com 6 semanas, as diferenças nos valores de torque de remoção foram significativamente diferentes entre o grupo de titânio e zircônia modificada com jateamento de sílica e entre zircônia sinterizada e zircônia modificada por jateamento de sílica. Ao fim de 12 semanas, a única diferença significativa no valor de torque de remoção existia entre titânio e zircônia modificada por jateamento de sílica, com titânio demonstrando um valor mais elevado de remoção.

Calvo-Guirado et al. (2013) realizaram uma pesquisa com implantes de zircônia instalados em cães, cujas superfícies foram tratadas com laser, submetidos à carga imediata, bem como tardia, para avaliação do COI e reabsorção da crista óssea em 30 e 90 dias. Quarenta e oito implantes foram inseridos, divididos em dois grupos: Vinte e quatro implantes para carga imediata e vinte e quatro implantes que permaneceram sem carga durante o período de osseointegração. O grupo submetido à carga imediata obteve maior percentual de COI. Estes valores médios em 30 dias foram de 38,9% para implantes submetidos à carga e de 32% para os casos de carga tardia ($P < 0,031$). Em 90 dias, os valores aumentaram para 65% e 57,6% respectivamente ($P = 0,005$). A estabilidade alcançada pelos implantes foi maior aos 30 e 90 dias, quando submetidas à carga imediata, assim como a reabsorção da crista óssea foi menor para esses mesmos implantes.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Salem et al. (2012) avaliaram implantes de zircônia com superfícies modificadas pela técnica de fusão, por um jateamento da suspensão do mesmo material, após sinterização. O objetivo deste estudo foi investigar, em 30 coelhos, a osseointegração desses dispositivos, em comparação com implantes de titânio tratados com jateamento e condicionamento ácido (SLA) e de zircônia sem tratamento de superfície. Foram inseridos 90 implantes em proporções iguais e avaliados em um intervalo de 4, 8 e 12 semanas. Em todos os intervalos de tempo testados, os implantes de zircônia tratados demonstraram valores de torque de remoção (RTQ) médios, estatisticamente mais elevados do que a do controle de zircônia, no entanto, quando comparados com implantes de titânio, embora ainda numericamente mais elevada, as diferenças não atingiram significância estatística. Ao fim de 4 semanas de cicatrização, foi possível observar a presença de trabeculado ósseo recém-formado em contato direto com todas as

superfícies de implantes. Osteoblastos ativos secretando matriz óssea também foram evidentes. Um aumento na aposição óssea em todas as superfícies de implantes estudados pode ser observada após 8 semanas de cicatrização. Após 12 semanas, constatou-se uma osseointegração de todos os implantes, com contato íntimo de osso lamelar maduro. Para todos os tipos de implantes, os valores de COI mostraram um aumento de 4 a 12 semanas. Após uma cicatrização de 4 semanas, os implantes de zircônia tratados demonstraram um COI significativamente maior ($P < 0,001$) em comparação a ambos os implantes de titânio e controle de zircônia. A média para os implantes de zircônia tratados foi $69,66 \pm 3,46\%$, após 4 semanas de implantação. Após 8 semanas de cicatrização, observou-se o mesmo padrão de resposta. Em 12 semanas não houve diferença significativa entre os implantes avaliados, sendo de $89,09 \pm 2,81\%$ para os implantes de zircônia tratados, $86,77 \pm 3,09\%$ para os de titânio e de $74,76 \pm 3,85\%$ para os de zircônia sem tratamento de superfície.

Um estudo histológico para avaliar a biocompatibilidade de uma superfície de zircônia foi realizado por Mai et al. (2012). Foram inseridos 06 discos de zircônia em 6 calvárias de ratos, as quais foram divididos em 2 grupos. Os animais foram sacrificados com 4 e 8 semanas para avaliação. Após 28 dias, os cortes apresentaram um desenvolvimento pronunciado de vasos sanguíneos e regeneração óssea. Observou-se início de formação de osso trabecular, além de uma remodelação óssea secundária, ossificação intramebranosa e pequena quantidade de osteóide. Após 56 dias de cicatrização havia áreas ricas em células de tecido ósseo medular, com presença de osso em contato com os discos de zircônia. Osso secundário em remodelação foi encontrado neste período. Em contraste com os cortes realizados em quatro semanas de cicatrização, o número vasos foi reduzido. No exame histomorfométrico foi observado um osso regenerado com valor médio de 36,3% depois de 28 dias de cura. Após 56 dias de cicatrização houve uma formação de osso 1,6 vezes maior, representando 58,2%. Usando a mesma análise, 1% e 39,9% de contato osso-implante era visível após os referidos períodos, respectivamente.

Tetè et al., (2009) realizaram um estudo em porcos, para avaliar a orientação das fibras em torno de dois diferentes pescoços de implantes dentários: titânio usinado e zircônia. Nestes, 16% mostraram-se paralelas, 18% estavam paralela/oblíqua, 14% eram oblíquas, 6% oblíqua/perpendicular, 5%

perpendiculares, enquanto que 41% das fibras estavam sem orientação definida. A porcentagem de distribuição das fibras para o pescoço de titânio usinado foi bem semelhante: 58% foram paralelas, paralelas/oblíquas e oblíqua, 9% de oblíquas/perpendiculares e perpendicular e 33% sem orientação definida. Não houve diferença estatística significativa entre os implantes analisados e todos os espécimes mostraram tecido conjuntivo clinicamente saudável em torno dos implantes.

Para avaliar o efeito da proteína óssea morfogenética (rhBMP-2), combinada ao uso de implantes de zircônia, Lee et al. (2013) instalaram em 06 cães 48 implantes, dividindo em duas etapas, para avaliação com 3 e 6 semanas. Em um primeiro grupo foram instalados implantes de titânio para controle (AZT-N), em um segundo, implantes de zircônia após inserção do gel contendo rhBMP-2 (ATZ-B), em um terceiro acrescentando-se ao gel, matriz óssea humana desmineralizada (ATZ-D) e um quarto com DBM apenas. Para avaliar a taxa e extensão de osso em remodelação, marcadores ósseos fluorescentes foram administrados. O grupo AZT-B exibiu um COI mediano, na terceira semana, de 40%, o qual foi o menor valor entre os quatro implantes, embora não tenha havido diferença significativa entre o ATZ-B e o ATZ-D. Os valores de formação óssea não apresentaram diferença significativa entre os grupos de implantes entre 3 e 6 semanas. Seis semanas após a colocação dos implantes, os valores de COI foram significativamente mais elevados do que na terceira semana.

Hirota et al.(2014) avaliaram as respostas ósseas ao redor de implantes de zircônia, revestidos por hidroxiapatita. Uma fina camada de hidroxiapatita contendo carbonato (CA) revestia o dióxido de zircônio (Y - TZP) parcialmente estabilizado (CA -Y- TZP) para estabelecer um sistema de implante livre de metal. Para tanto foi usado um método precursor molecular. A película de CA foi depositada sobre a superfície de Y - TZP usando uma solução precursora, que era uma mistura de cálcio, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e compostos de fosfato. A película de CA foi marcada por difração de raios - X. A espessura da película de CA foi menor que 1,0 mm. Avaliações biológicas de CA - Y - TZP foram realizadas por imersão dos dispositivos em simulações de fluidos corporais (SBF) e implantação na tíbia e côndilos femorais de coelhos. Na fase inicial da imersão em SBF a deposição de apatita progrediu mais sobre CA -Y- TZP do que em Y - TZP, sem o revestimento CA. Experimentos em animais revelaram que a formação óssea em

CA - Y - TZP foi semelhante à Y - TZP. Avaliações histomorfométricas mostraram maior relação de contato osso-implante e maior massa óssea nos implantes CA -Y- TZP instalados no osso trabecular femoral de coelhos. Portanto, CA -Y- TZP parece ser aplicável a esses implantes livres de metal.

1.3- Estudos em humanos

As pesquisas em humanos relacionadas a implantes de zircônia são muito escassas. O que existe na literatura são relatos de casos clínicos, não há estudos publicados, até então, que avaliem o comportamento histológico desses dispositivos. Kohal et al. (2013) relataram que esses implantes apesar estarem no mercado há algum tempo, um embasamento científico sobre sua utilização é atrasada ou inexistente. Estudos de coorte, com um desenho bem definido são raros (Payer et al. 2013). As boas respostas fisiológicas, bem como os resultados positivos dos ensaios biológicos pré-clínicos podem incentivar o uso dos implantes de zircônia, o que induziu várias empresas a produzirem tais dispositivos (Silva et al. 2010). No entanto, Andreiotelli et al. (2009) e Depprich et al. (2014) relatam que a minoria dessas indústrias tem dados de pesquisas clínicas e alguns destes dados, ainda assim, são de qualidade científica questionável, em função do desenho inadequado do estudo.

Nesse sentido, Payer et al. (2013), avaliaram, 20 implantes unitários de zircônia de corpo único, inseridos em vinte pacientes, sendo 11 na mandíbula e 9 na maxila, com provisionalização imediata. A restauração definitiva foi realizada após 4 meses do procedimento cirúrgico (baseline). Foram avaliados índice de placa (IP), sangramento à sondagem (SS), Periotest® (PV), estética gengival (PES), níveis radiográficos da margem óssea (MBL) e o índice de sucesso dos implantes até 24 meses. Avaliação do IP no baseline e follow-up após 6, 12, 18 e 24 meses revelou 27% (\pm 5,3), 24% (\pm 6), 23% (\pm 6,1), 23% (\pm 5,3) e 22% (\pm 6,4), respectivamente. Avaliação de SS revelou 25% (\pm 5,6), 21% (\pm 6), 21% (\pm 7,2), 18% (\pm 5,9) e 15% (\pm 5,5), respectivamente. Com relação ao PV os implantes apresentaram-se estáveis durante o acompanhamento. O PES melhorou, mas não houve diferença estatisticamente significativa, sendo de 8,13 (\pm 1,5) no baseline a 10 (\pm 2) 24 meses após a implantação. Medições da MBL mostraram uma perda

óssea significativa de 1,01 milímetros dentro do primeiro ano após a colocação ($P < 0,001$) e 1,29 milímetros em 24 meses, não sendo estatisticamente significativa ($P > 0,05$). Um implante foi perdido 4 meses após a colocação, o que resulta em sobrevivência e uma taxa de sucesso de 95%.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Kohal et al. (2013) realizaram um estudo prospectivo, antes de um sistema de implantes de zircônia a ser lançado no mercado. Vinte e oito pacientes receberam cinquenta e seis implantes com cirurgias de fase única, nas quais foram inseridos dois implantes. Pontes fixas provisórias com três coroas foram instaladas imediatamente. As próteses definitivas foram confeccionadas com 6 semanas para os implantes inseridos na mandíbula e 14 semanas para maxila. Avaliações radiográficas padronizadas foram realizadas para investigação da perda óssea marginal. Foi considerado sucesso grau I, quando havia perda óssea ≤ 2 mm após 01 ano e não havia sinais clínicos e radiográficos de doença peri-implantar. O sucesso grau II, foi aplicado aos implantes sem sinais de patologia, mas com uma perda óssea ≤ 3 mm, após 01 ano de acompanhamento. Foram feitas avaliações clínicas com 06 meses e 01 ano. Dos 28 pacientes, 27 pacientes receberam a restauração final. Houve falha de 01 implante antes da reabilitação. Portanto, a taxa de sucesso dos implantes após 01 ano foi de 98,2%. O paciente foi excluído de análises posteriores. Uma reabsorção óssea média de 1,65 mm pôde ser observada a partir da inserção do implante até a entrega prótese definitiva. A perda óssea marginal após 1 ano foi de 1,95 mm. Em 40% dos pacientes houve perda óssea de pelo menos 2 mm, e em 28% dos pacientes foi observada uma perda maior que 3 mm.

Borgonovo et al. (2010) realizaram um estudo prospectivo, no qual foram inseridos 46 implantes de zircônia, em 18 pacientes, com acompanhamento de 6 e 24 meses. O índice de sucesso obtido em osso nativo foi de 97%. Portanto, as taxas de sobrevida foram semelhantes aos implantes de titânio.

Como pode ser observado, a literatura disponível em humanos com relação aos implantes de zircônia limita-se a relatos de caso ou ensaios clínicos com tempo de acompanhamento bastante reduzido. Ainda, as pesquisas com dados histológicos desses implantes, hodiernamente, restringem-se a estudos em animais, cujos resultados são semelhantes aos encontrados para os implantes convencionais de titânio, variando, em média, um COI de 30 a 70% (Hoffmann et al., 2008; Salem et al., 2012; Mai et al., 2012; Lee et al., 2013; Guirado et al., 2013).

Com isso, o presente estudo vem complementar o que existe na literatura com relação aos implantes de zircônia, uma vez que se propõe a avaliar, em humanos, os parâmetros que vem sendo observados em animais, no tocante ao comportamento histológico desses dispositivos intra-ósseos.

2. OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar, por meio de parâmetros histométricos (contato osso-implante e densidade óssea) de implantes de zircônia, comparados a implantes de titânio com superfície tratada, inseridos em humanos, instalados na região posterior de maxila.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Por envolver os dados clínicos de implantes realizados em seres humanos, este experimento foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP da Universidade Guarulhos protocolo: CEP 201/03

3.2 Seleção dos indivíduos

Oito indivíduos (5 mulheres e 3 homens), maiores de 21 anos, provenientes da Clínica de Implantodontia da Universidade Guarulhos, e que apresentavam necessidade de reabilitação oral com implantes osseointegráveis na região posterior de maxila, foram incluídos no presente estudo.

3.3 Critérios de inclusão dos indivíduos na amostra

Para a participação neste estudo, os indivíduos deveriam preencher os seguintes requisitos clínicos, a saber:

1. Necessidade de reabilitação oral com implantes osseointegráveis na região posterior de maxila;
2. Disponibilidade óssea para inserção dos implantes osseointegráveis na área de eleição;
3. Apresentar área de túber edêntula;
4. Não apresentar doença periodontal no momento da cirurgia de inserção dos implantes;
5. Não apresentar alvéolos frescos nos sítios de instalação dos implantes.

Os indivíduos incluídos na amostra populacional foram informados dos procedimentos cirúrgicos e protéticos e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.5. Critérios de exclusão de indivíduos da amostra

1. Gravidez e lactação;
2. Apresentar histórico de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, hepatite, febre reumática, asma, diabetes, desordens imunes ou sanguíneas ou outras doenças que contra-indicassem a realização da cirurgia.

3.6. Implantes Utilizados

Neste estudo foram utilizados dezesseis micro-implantes rosqueáveis, em forma de parafuso, com 2,2 milímetros de diâmetro e 4mm de comprimento: oito feitos de titânio grau-4, cuja superfície foi jateada com óxido de alumínio (Al_2O_3) e condicionadas com o ácido nítrico (HNO_3) e oito de zircônia tetragonal policristal estabilizada com ítrio, ambos gentilmente cedidos pela AS Technology do Brasil (Titanium Fix, São José dos Campos, Brasil).

3.7. Desenho experimental e protocolo cirúrgico utilizado

Cada paciente recebeu 2 micro-implantes: 1 de titânio (grupo controle) e outro de zircônia (grupo teste), na região posterior de maxila, sempre à distal dos implantes convencionais planejados para cada reabilitação. Os implantes foram instalados seguindo todos os protocolos de biossegurança necessários para o procedimento. Brevemente, após a assepsia oral com clorexidina 0,12% e anestesia local, foi realizada incisão para o descolamento total do retalho na região a ser operada.

O leito receptor do micro-implante foi então preparado utilizando-se uma fresa de 1,8mm de diâmetro, seguindo as instruções do fabricante. Logo após o preparo do leito cirúrgico, o micro-implante foi inserido com a utilização de uma chave hexagonal. Caso o micro-implante não apresentasse ligeira estabilidade primária, outra loja cirúrgica era preparada para melhor acomodação do mesmo.

A fresagem óssea e a inserção dos implantes foram realizadas sob abundante irrigação com solução salina estéril. Após inserção dos implantes as bordas do retalho foram reaproximadas e suturadas com fios de seda em pontos simples interrompidos. Por 7 dias após a cirurgia foi administrada clindamicina 300 mg de 8

em 8 horas, com o intuito de prevenir infecções no local da cirurgia e diclofenaco potássico 50mg foi administrado de 8 em 8 horas, por 5 dias, para o controle da inflamação e dor. No período pós-cirúrgico foi realizada, também, aplicação tópica de digluconato de clorexidina na concentração de 0,12% duas vezes ao dia, durante 14 dias. As suturas foram removidas 10 dias após a instalação dos implantes.

Após um período de 60 dias os micro-implantes e o tecido ósseo ao seu redor foram removidos com uma fresa trefina de 4mm de diâmetro. As amostras foram fixadas em formol tamponado 4%, pH 7, por 3 dias.

3.8. Processamento histológico das amostras e análise histométrica

Após o processo de fixação, as amostras foram lavadas por 24 horas em água corrente e armazenadas em álcool etílico 70% até o processamento. Continuando o processamento, as peças foram, então, desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico (80%, 90%, 96%, e dois banhos em etanol 100%) sob constante agitação.

Após o processo de desidratação, as amostra foram submetidas à infiltração plástica, por meio de soluções de glicolmetacrilato (Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Alemanha) e álcool etílico, seguindo variações gradativas na proporção álcool/glicolmetacrilato (70/30, 50/50, 30/70), finalizando com duas infiltrações de glicolmetacrilato puro, sob agitação constante.

Após a infiltração plástica os espécimes foram incluídos em resina e polimerizados. O bloco foi, então, removido do molde e montado em uma lâmina acrílica com auxílio da resina Technovit 4000 (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Alemanha). Por meio da utilização de um sistema de corte (EXAKT Apparatebau GmbH & Co, Norderstedt, Schleswig-Holstein, Alemanha) (Donath, Breuner⁵⁹, 1982), foi realizado o corte preliminar visando o centro do implante. O corte obtido foi polido e colado em uma lâmina com uma resina adesiva de precisão (Technovit 7210 VLC, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Alemanha).

Um novo corte foi realizado, obtendo-se uma secção de aproximadamente 100µm, que em seguida foi submetida a um sistema de micro desgaste e polimento, resultando em uma secção de aproximadamente 50 µm de espessura. As lâminas foram coradas com fucsina ácida e azul de toluidina a 1% (Sigma

Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e os parâmetros histométricos analisados foram:

1. Percentual do contato osso-implante (COI%): medida do percentual de extensão linear de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante em relação ao seu perímetro total (figura 1);

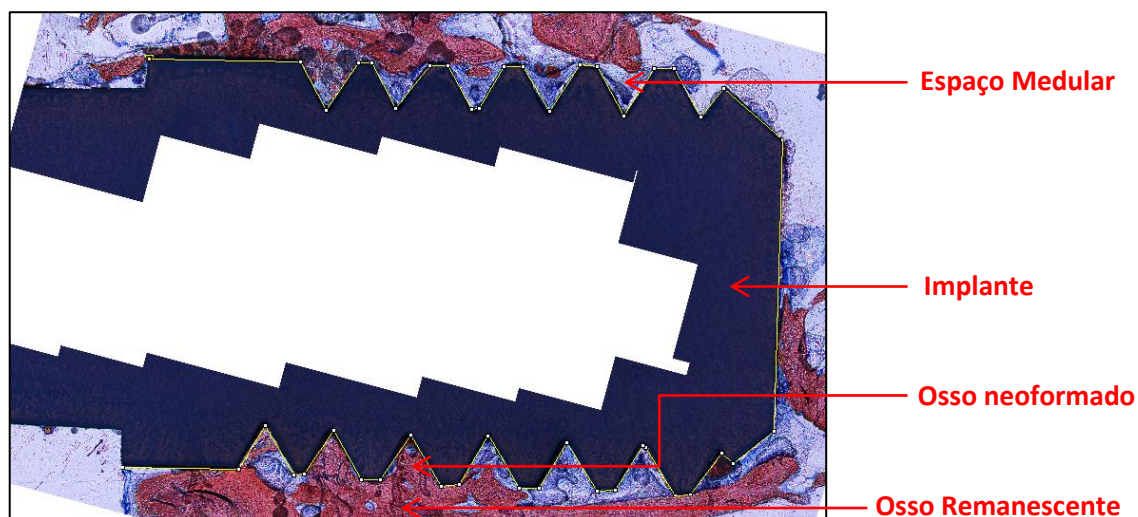


FIGURA 1. Foto representativa da aquisição do perímetro total do implante (em amarelo).

2. Densidade óssea entre as roscas do implante (DO%): percentual da quantidade óssea formada entre a área total das roscas do implante (figura 2).

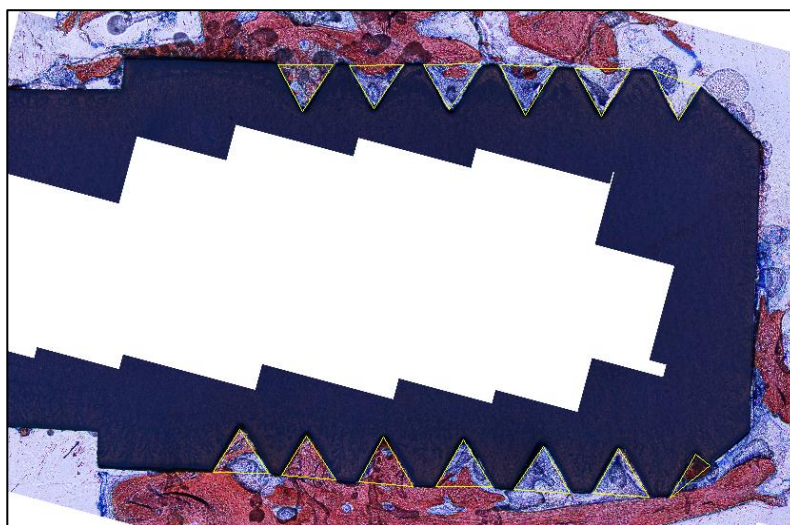


FIGURA 2. Foto representativa da aquisição da área total de roscas do implante.

As mensurações foram realizadas utilizando-se um microscópio óptico (LEICA DM 2500 - Leica Microscopy and Scientific Instruments Group, Wetzlar, Alemanha), em aumento de 50 vezes. As imagens foram selecionadas e enviadas para um microcomputador (Intel Core 2 duo, 2.33 GHz, 2 Gb RAM) por meio de uma câmera de vídeo (LEICA DFC-295 - Leica Microsystems Ltda, Wetzlar, Alemanha), acoplada ao microscópio óptico. A determinação dos valores foi realizada empregando-se um software analisador de imagens (ImageJ 1.47 - National Institute of Health, Bethesda, EUA). Os valores para a extensão linear de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante e densidade óssea entre as roscas ocupadas por tecido ósseo foram expresso em porcentagem.

3.8 Análise estatística

A avaliação da normalidade dos dados foi realizada por meio do uso do teste Kolmogorov-Smirnov. Em seguida os dados foram analisados pelo teste de Mann Whitney. O nível de significância foi estabelecido em 5% e a hipótese de nulidade foi rejeitada se $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

A avaliação da quantidade de tecido ósseo em contato com a superfície do implante (COI%) não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos do estudo, apresentando um COI médio de $43,98\% \pm 10,74$ para o grupo controle e $41,88\% \pm 8,25$ para o teste, como mostra a figura 3.

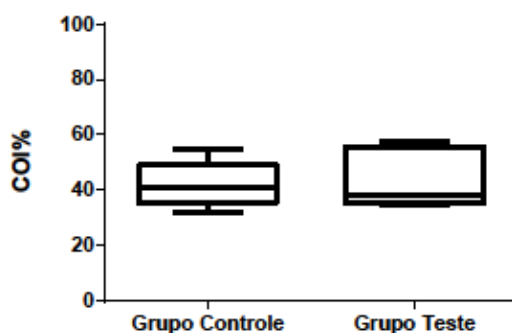


FIGURA 3. Representação gráfica do percentual da extensão linear de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante (COI%).

Por outro lado, na comparação da quantidade da área de rosca preenchida por tecido ósseo (DO%), observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,0483$), com menor porcentagem de tecido ósseo preenchendo a área de roscas dos implantes do grupo teste ($49,32 \pm 8,21$), em relação ao grupo controle ($57,8\% \pm 21,48$), como mostrado na figura 4.

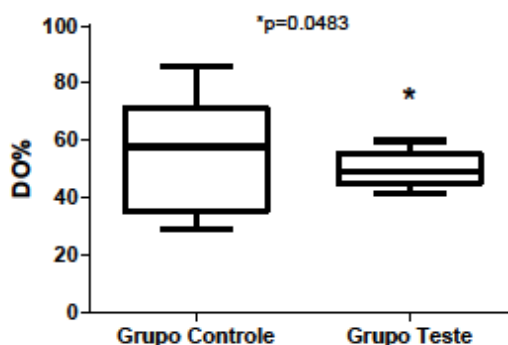


FIGURA 4. – Representação gráfica do percentual da área entre as roscas ocupadas por tecido ósseo (DO%).

Histologicamente, pôde-se observar boa afinidade óssea para ambos os tipos de implantes, com presença de osso lamelar em processo de maturação, bem como conjuntos lamelares concêntricos, com formação de canais haversianos na área próxima ao implante, como indicado pelas setas presentes nas Figura 5A e 5B.

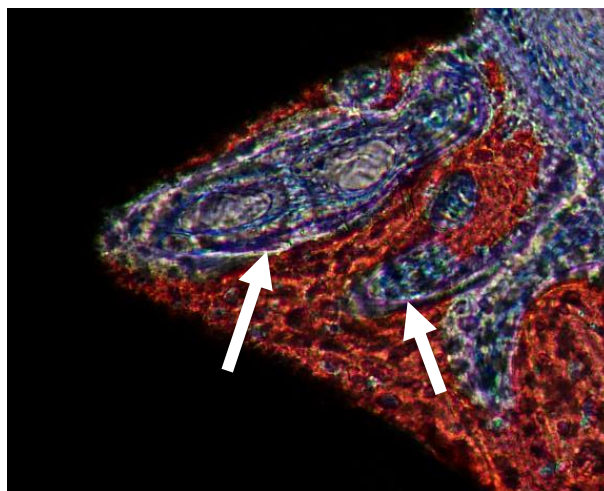


FIGURA 5A. Histomicrografias representativas do grupo controle (100x).

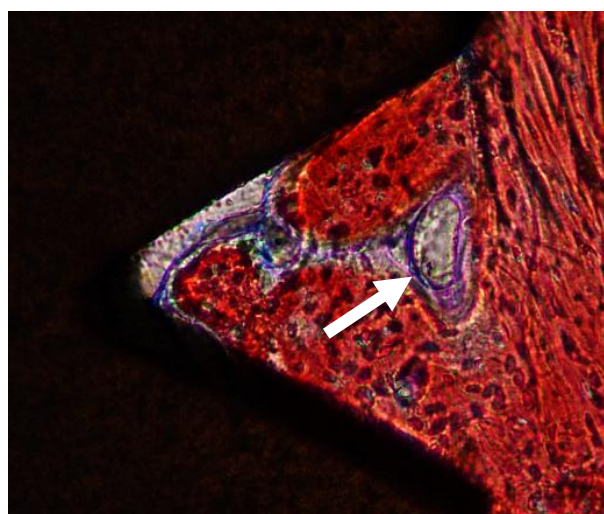


FIGURA 5B. Histomicrografias representativas do grupo teste (100x).

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi comparar, por meio de análises histológicas, a resposta de implantes de zircônia inseridos em maxilares humanos, comparados aos implantes de titânio com superfície jateada, que, rotineiramente, tem sido utilizados em reabilitações orais de áreas desdentadas. Os resultados histológicos encontrados mostraram-se bastante satisfatórios e corresponderam aos achados de estudos anteriores realizados em animais, com implantes de zircônia (Hoffmann et al., 2008; Salem et al., 2013; Mai et al., 2012; Lee et al., 2013; Calvo-Guirado et al., 2013). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos analisados, para o contato osso-implante (COI), embora a área de rosca preenchida por tecido ósseo (DO), do grupo teste, tenha sido significativamente menor ($p=0,0483$).

As taxas de osseointegração dos implantes desse estudo corroboram com os achados relatados por diversos autores, em relação aos implantes de titânio com tratamento de superfície, inseridos tanto em animais, como em humanos, as quais apontam uma variação de 30 a 70% para os valores médio de COI (Buser et al., 1991; Wennerberg et al., 1995; Piattelli et al., 1998; Buser et al., 1998; Hallgren et al., 2001; Ivanoff et al., 2001; Ivanoff et al., 2003; Kohal et al., 2003; Degidi et al., 2003; Abrahamsson et al., 2004; Berglundh et al., 2003; Shibli et al., 2007).

Os implantes de zircônia utilizados neste estudo não apresentavam qualquer tipo de tratamento de superfície, diferentemente de alguns estudos encontrados na literatura, nos quais foram avaliados diferentes tipos de tratamento da zircônia, com o intuito de otimizar a afinidade do tecido ósseo pela zircônia. Hoffmann et al. (2008) encontraram após 6 semanas de reparo um COI médio de 32,9% para a zircônia sinterizada, 39,9% zircônia modificado por laser, e 39,6% para a modificada com jateamento de sílica, valores similares aos encontrados neste estudo, de aproximadamente 44% de contato osso-implante após 8 semanas de reparo, mesmo sem nenhum tipo de tratamento superficial. O mesmo foi relatado por Calvo-Guirado et al. (2013), que utilizaram implantes de zircônia, cujas superfícies foram tratadas com laser, submetidos à carga imediata, bem como tardia, obtendo um COI médio de 30 e 32%, para 30 dias e de 65% e 57.6%, para 90 dias, respectivamente, para os referidos tipos de carregamento. Ainda, Mai et al. (2012), testaram a superfície MDS, encontrando um COI médio de 39,9%, após 56 dias de osseointegração. Por outro lado, Salem et al. (2013) utilizaram uma

modificação na superfície pela técnica de fusão, por um jateamento da suspensão do mesmo material, após sinterização e encontraram após 8 semanas de reparo, um contato osso-implante de $69,66 \pm 3,46\%$, mostrando-se superior aos achados deste, e dos estudos anteriormente citados.

Em consonância com as pesquisas de Berglundh et al. (2004), Abrahamsson et al. (2004), realizadas com implantes de titânio, em animais, e Shibli et al. (2007) em humanos, os tecidos em torno da superfície dos implantes avaliados neste estudo mostraram-se satisfatórios. Pôde-se observar boa afinidade óssea para ambos os tipos de implantes, com presença de osso lamelar em processo de maturação, com formação de canais haversianos nas áreas próximas a estes dispositivos intra-ósseos.

Com relação à menor densidade óssea apresentada pelos implantes do grupo teste, devemos levar em consideração a variabilidade apresentada pelos implantes do grupo controle. Apesar do implantes de zircônia apresentarem menor taxa de osso interposto entre as roscas dos implantes, esses apresentaram uma distribuição de valores com pequena variação entre os resultados apresentados (de 40 a 60%) enquanto os implantes de titânio não mostraram um padrão de osseointegração regular, apresentando variações de 30 a 90% na taxa de densidade óssea entre as roscas. Além disso, os resultados desse estudo estão de acordo com os achados na literatura com relação aos implantes de zircônia, que mostram uma tendência à superioridade do titânio frente à zircônia, apesar de nenhum deles avaliar a quantidade de tecido ósseo preenchendo as roscas dos implantes e também não evidenciarem uma diferença estatisticamente significativa entre os implantes de titânio e zircônia (Calvo-Guirado et al., 2013).

Devemos salientar ainda, que mesmo apresentando menores valores de DO, aos 60 dias de osseointegração, os implantes de zircônia apresentaram uma boa resposta biológica. Estudos *in vitro* com cultura de osteoblastos, demonstraram, também, a semelhança de resultados entre o titânio e a zircônia, sugerindo uma equivalência de resultados para estes materiais no que diz respeito ao comportamento biológico (Han et al. 2011; Gong et al. 2013). Payer et al. (2013), instalaram 20 implantes unitários de zircônia de corpo único e obtiveram 95% de taxa de sucesso, Kohal et al. (2013) instalaram 56 implantes de zircônia, havendo perda de 01 implante, obtendo, com isso, 98,2% de êxito no tratamento. Borgonovo et al. (2010), alcançaram um índice global de sucesso em torno de 94%. Estas

pesquisas demonstram índices semelhantes de sucesso dos implantes de zircônia, em relação aos de titânio, o que corroboram clinicamente, com os resultados histológicos encontrados no nosso estudo.

Frente aos achados no presente estudo, podemos sugerir que os implantes de zircônia apresentam plausibilidade biológica para sua utilização em humanos, porém outros estudos ainda são necessários visando atestar sua longevidade e taxa de sucesso frente às cargas mastigatórias em que esses tipos de dispositivo deverão ser submetidos. Ainda, faz-se mister o delineamento de ensaios clínicos aleatorizados controlados, com longo período de acompanhamento, que atestem a possibilidade de substituição dos implantes de titânio pelos de zircônia, sem comprometer o sucesso do tratamento reabilitador e a segurança desses pacientes.

6. CONCLUSÃO

Por meio deste estudo, com suas limitações, sugere-se que os implantes de zircônia demonstram-se eficientes no que diz respeito à osseointegração, sob o ponto de vista histológico, apresentando resultados semelhantes ao titânio (COI), na ausência de carga mastigatória, embora o grupo teste tenha demonstrado uma densidade óssea entre as roscas do implante (DO) estatisticamente menor que o grupo controle.

7. REFERÊNCIAS

Aboushelib MN, Salem NA, Taleb AL, El Moniem NM. Influence of surface nano-roughness on osseointegration of zirconia implants in rabbit femur heads using selective infiltration etching technique. *J Oral Implantol*. 2013 Oct;39(5):583-90.

Abrahamsson I, Berglundh T, Linder E, Lang NP, Lindhe J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2004 Aug;15(4):381-92.

Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Brånemark PI, Jemt T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1990 Winter;5(4):347-59.

Akagawa Y, Hosokawa R, Sato Y, Kamayama K. Comparison between freestanding and tooth-connected partially stabilized zirconia implants after two years' function in monkeys: a clinical and histologic study. *J Prosthet Dent*. 1998 Nov;80(5):551-8.

Albrektsson T, Sennerby L, Wennerberg A. State of the art of oral implants. *Periodontol*, 2000. 2008;47:15-26.

Andreiotelli M, Wenz HJ, Kohal RJ. Are ceramic implants a viable alternative to titanium implants? A systematic literature review. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Sep;20 Suppl 4:32-47.

Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Jun;14(3):251-62.

Bianchi AE, Bosetti M, Dolci G Jr, Sberna MT, Sanfilippo S, Cannas M. In vitro and in vivo follow-up of titanium transmucosal implants with a zirconia collar. *J Appl Biomater Biomech*. 2004 Sep-Dec;2(3):143-50.

Borgonovo AE, Arnaboldi O, Censi R, Dolci M, Santoro G.. Edentulous jaws

rehabilitation with yttrium-stabilized zirconium dioxide implants: two years follow-up experience. *Minerva Stomatol.* 2010 Jul-Aug;59(7-8):381-92.

Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1969;3(2):81-100.

Buser D, Nydegger T, Hirt HP, Cochran DL, Nolte LP. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998 Sep-Oct;13(5):611-9.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res.* 1991 Jul;25(7):889-902.

Calvo-Guirado JL, Aguilar-Salvatierra A, Gomez-Moreno G, Guardia J, Delgado-Ruiz RA, Mate-Sanchez de Val JE. Histological, radiological and histomorphometric evaluation of immediate vs. non-immediate loading of a zirconia implant with surface treatment in a dog model. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Apr 2. doi: 10.1111/clr.12145.

Covacci V1, Bruzzese N, Maccauro G, Andreassi C, Ricci GA, Piconi C, Marmo E, Burger W, Cittadini A. In vitro evaluation of the mutagenic and carcinogenic power of high purity zirconia ceramic. *Biomaterials.* 1999 Feb;20(4):371-6.

Degidi M, Artese L, Franceschini N, Sulpizio S, Piattelli A, Piccirilli M, Perrotti V, Iezzi G. Matrix metalloproteinases 2, 3, 8, 9, and 13 in the peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013 Nov-Dec;28(6):1546-51.

Degidi M, Petrone G, Iezzi G, Piattelli A. Bone contact around acid-etched implants: a histological and histomorphometrical evaluation of two human-retrieved implants. *J Oral Implantol.* 2003;29(1):13-8.

Depprich R, Naujoks C, Ommerborn M, Schwarz F, Kübler NR, Handschel J. Current findings regarding zirconia implants. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014 Feb;16(1):124-37.

Dierens M, Vandeweghe S, Kisch J, Nilner K, De Bruyn H. Long-term follow-up of turned single implants placed in periodontally healthy patients after 16-22 years: radiographic and peri-implant outcome. *Clin Oral Implants Res*. 2012 Feb;23(2):197-204.

Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends Biotechnol*. 2010 Apr;28(4):198-206.

Friskén KW, Dandie GW, Lugowski S, Jordan G. A study of titanium release into body organs following the insertion of single threaded screw implants into the mandibles of sheep. *Aust Dent J*. 2002 Sep;47(3):214-7.

Gong SH, Lee H, Pae A, Noh K, Shin YM, Lee JH, Woo YH. Gene expression of MC3T3-E1 osteoblastic cells on titanium and zirconia surface. *J Adv Prosthodont*. 2013 Nov;5(4):416-22.

Hallgren C, Sawase T, Ortengren U, Wennerberg A. Histomorphometric and mechanical evaluation of the bone-tissue response to implants prepared with different orientation of surface topography. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2001;3(4):194-203.

Han SH, Kim KH, Han JS, Koo KT, Kim TI, Seol YJ, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC. Response of osteoblast-like cells cultured on zirconia to bone morphogenetic protein-2. *J Periodontal Implant Sci*. 2011 Oct;41(5):227-33.

Hirota M, Hayakawa T, Ohkubo C, Sato M, Hara H, Toyama T, Tanaka Y. Bone responses to zirconia implants with a thin carbonate-containing hydroxyapatite coating using a molecular precursor method. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014 Jan 21.

Hoffmann O, Angelov N, Gallez F, Jung RE, Weber FE. The zirconia implant-bone interface: a preliminary histologic evaluation in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008 Jul-Aug;23(4):691-5.

Ivanoff CJ, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO(2) blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res*. 2001 Apr;12(2):128-34.

Ivanoff CJ, Widmark G, Johansson C, Wennerberg A. Histologic evaluation of bone response to oxidized and turned titanium micro-implants in human jawbone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003 May-Jun;18(3):341-8.

Javed F, Al-Hezaimi K, Almas K, Romanos GE. Is titanium sensitivity associated with allergic reactions in patients with dental implants? A systematic review. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013 Feb;15(1):47-52.

Jemt T, Chai J, Harnett J, Heath MR, Hutton JE, Johns RB, McKenna S, McNamara DC, van Steenberghe D, Taylor R, Watson RM, Herrmann I. A 5-year prospective multicenter follow-up report on overdentures supported by osseointegrated implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996 May-Jun;11(3):291-8.

Kan JY, Rungcharassaeng K, Lozada JL, Zimmerman G. Facial gingival tissue stability following immediate placement and provisionalization of maxillary anterior single implants: a 2- to 8-year follow-up. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011 Jan-Feb;26(1):179-87.

Koch FP, Weng D, Krämer S, Biesterfeld S, Jahn-Eimermacher A, Wagner W. Osseointegration of one-piece zirconia implants compared with a titanium implant of identical design: a histomorphometric study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Mar;21(3):350-6.

Kohal RJ, Bächle M, Emmerich D, Beschmidt SM, Strub JR. Hard tissue reaction to dual acid-etched titanium implants: influence of plaque accumulation. A histological

study in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Aug;14(4):381-90.

Kohal RJ, Patzelt SB, Butz F, Sahlin H. One-piece zirconia oral implants: one-year results from a prospective case series. 2. Three-unit fixed dental prosthesis (FDP) reconstruction. *J Clin Periodontol.* 2013 May;40(5):553-62.

Lee BC, Yeo IS, Kim DJ, Lee JB, Kim SH, Han JS. Bone formation around zirconia implants combined with rhBMP-2 gel in the canine mandible. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Dec;24(12):1332-8.

Lundgren AK, Lundgren D, Wennerberg A, Hämmerle CH, Nyman S. *Clin Implant Dent Relat Res.* 1999;1(1):41-8.

Mai R, Kunert-Keil C, Grafe A, Gedrange T, Lauer G, Dominiak M, Gredes T. Histological behaviour of zirconia implants: an experiment in rats. *Ann Anat.* 2012 Nov;194(6):561-6.

Malo P, de Araújo Nobre M, Lopes A, Moss SM, Molina GJ. A longitudinal study of the survival of All-on-4 implants in the mandible with up to 10 years of follow-up. *J Am Dent Assoc.* 2011 Mar;142(3):310-20.

Rocchietta I, Fontana F, Addis A, Schupbach P, Simion M. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Aug;20(8):844-50.

Nisapakultorn K, Suphanantachat S, Silkosessak O, Rattanamongkolgul S. Factors affecting soft tissue level around anterior maxillary single-tooth implants. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Jun;21(6):662-70.

Payer M, Arnetzl V, Kirmeier R, Koller M, Arnetzl G, Jakse N. Immediate provisional restoration of single-piece zirconia implants: a prospective case series - results after 24 months of clinical function. *Clin Oral Implants Res.* 2013 May;24(5):569-75.

Piattelli A, Piattelli M, Mangano C, Scarano A. A histologic evaluation of eight cases of failed dental implants: is bone overheating the most probable cause?

Biomaterials. 1998 Apr-May;19(7-9):683-90.

Pigatto PD, Guzzi G, Brambilla L, Sforza C. Titanium allergy associated with dental implant failure. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Aug;20(8):857.

Rimondini L, Cerroni L, Carrassi A, Torricelli P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002 Nov-Dec;17(6):793-8.

Rocci A, Martignoni M, Burgos PM, Gottlow J, Sennerby L. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2003;5 Suppl 1:88-98.

Salem NA, Abo Taleb AL, Aboushelib MN. Biomechanical and histomorphometric evaluation of osseointegration of fusion-sputtered zirconia implants. *J Prosthodont.* 2013 Jun;22(4):261-7.

Scarano A, Di Carlo F, Quaranta M, Piattelli A. Bone response to zirconia ceramic implants: an experimental study in rabbits. *J Oral Implantol.* 2003;29(1):8-12.

Sennerby L, Dasmah A, Larsson B, Iverhed M. Bone tissue responses to surface-modified zirconia implants: A histomorphometric and removal torque study in the rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2005;7 Suppl 1:S13-20.

Shibli JA, Grassi S, de Figueiredo LC, Feres M, Marcantonio E Jr, Iezzi G, Piattelli A. Influence of implant surface topography on early osseointegration: a histological study in human jaws. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007 Feb;80(2):377-85.

Sicilia A, Cuesta S, Coma G, Arregui I, Guisasola C, Ruiz E, Maestro A. Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Aug;19(8):823-35.

Siddiqi A, Payne AG, De Silva RK, Duncan WJ. Titanium allergy: could it affect dental implant integration? *Clin Oral Implants Res.* 2011 Jul;22(7):673-80.

Silva NRFA, Sailer I, Zhang Y, Coelho, PG, Guess PC, Zembic A, Kohal RJ. Performance of zirconia for dental healthcare. *Materials*. 2010, 3(2), 863-896.; doi:10.3390/ma3020863

Stadlinger B, Hennig M, Eckelt U, Kuhlisch E, Mai R. Comparison of zirconia and titanium implants after a short healing period. A pilot study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Jun;39(6):585-92.

Tetè S, Mastrangelo F, Bianchi A, Zizzari V, Scarano A. Collagen fiber orientation around machined titanium and zirconia dental implant necks: an animal study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Jan-Feb;24(1):52-8.

Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, Rao W, Testori T, Porter SS. *J Periodontol*. 2003 Jul;74(7):945-56.

Verdugo F, Simonian K, Nowzari H. Periodontal biotype influence on the volume maintenance of onlay grafts. *J Periodontol*. 2009 May;80(5):816-23.

Weingart D, Steinemann S, Schilli W, Strub JR, Hellerich U, Assenmacher J, Simpson J. Titanium deposition in regional lymph nodes after insertion of titanium screw implants in maxillofacial region. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1994 Dec;23(6 Pt 2):450-2.

Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implants Res*. 1995 Mar;6(1):24-30.

Yamauchi R, Morita A, Tsuji T. Pacemaker dermatitis from titanium. *Contact Dermatitis*. 2000 Jan;42(1):52-3.